

APPARATUS FOR DETERMINING BASE SEQUENCE

Patent Number: JP4244953
Publication date: 1992-09-01
Inventor(s): FUJII HIDEHIKO; others: 01
Applicant(s): SHIMADZU CORP
Requested Patent: JP4244953
Application Number: JP19910032505 19910131
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N27/447; C12M1/00; C12Q1/68
EC Classification:
Equivalents: JP2035869C, JP7060146B

Abstract

PURPOSE: To make the shape of a filter clear in the Fourier filter processing of a fluorescent migration signal and to apply Fourier filter processing even to a long migration time series signal.

CONSTITUTION: Data is divided into data regions so that the respective regions are partially superposed one upon another and Fourier transform is applied to the respective regions by a fast Fourier transform means. After Fourier transform, the respective regions are applied to a band-pass filter (low-pass F_l, high-pass F_h) by a filter means 42. Thereafter, a time function is again restored by a fast inverse Fourier transform means 44 and the real part thereof is taken. By this method, a signal wherein noise is removed from the original signal is obtained. The processing results of two regions are subjected to weighting average processing in an averaging part 46 and, finally, data of A0-A10000 are obtained. A signal having a good S/N ratio can be obtained and the error of base sequence determination is reduced. Application becomes wide and, for example, processing near to real time processing becomes possible.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-244953

(43)公開日 平成4年(1992)9月1日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 01 N 27/447				
C 12 M 1/00	A 9050-4B			
C 12 Q 1/68	Z 8114-4B 7235-2J		G 01 N 27/26	3 2 5 E

審査請求 未請求 請求項の数3(全6頁)

(21)出願番号 特願平3-32505

(22)出願日 平成3年(1991)1月31日

(71)出願人 000001993
株式会社島津製作所
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72)発明者 藤井 英彦
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
株式会社島津製作所三条工場内

(72)発明者 柏木 克也
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
株式会社島津製作所三条工場内

(74)代理人 弁理士 野口 繁雄

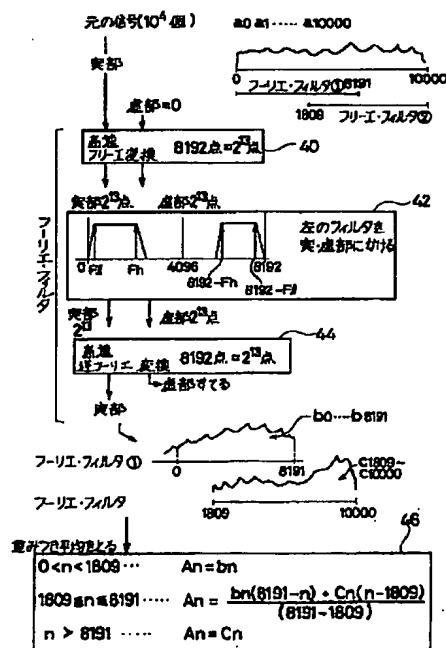
(54)【発明の名称】 塩基配列決定装置

(57)【要約】

【目的】 蛍光泳動信号のフーリエ・フィルタ処理において、フィルタの形を明確にする。また、長い泳動時系列信号に対してもフーリエ・フィルタ処理できるようにする。

【構成】 データを一部が重なるように分割し、それぞれの領域に対してフーリエ変換手段40でフーリエ変換を施す。フーリエ変換後、フィルタ手段42で帯域フィルタ(低域F_l、高域F_h)にかける。その後、逆フーリエ変換手段44で再び時間関数に戻し、その実部を探る。これにより元の信号からノイズが除去された信号が得られる。2領域の処理結果を平均化部46で重みつき平均処理し、最終的にA₀～A₁₀₀₀₀のデータを得る。

【効果】 S/N比のよい信号が取得できるようになり、塩基配列決定の誤差が少なくなる。応用が広がり、例えばリアルタイム処理に近い処理も可能になる。



1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 蛍光ラベルした核酸断片をゲル電気泳動させ、その展開パターンを蛍光検出して得た泳動レーンの時系列信号をフーリエ変換するフーリエ変換手段、フーリエ変換後の信号にフィルタ関数を乗算するフィルタ処理を施すフィルタ手段、及びフィルタ関数乗算後の信号を逆フーリエ変換する逆フーリエ変換手段を備えて信号処理を施した後に塩基配列を決定する装置において、前記フィルタ関数はフーリエ変換後の関数の実部と虚部に同じ形でかける帯域通過フィルタとし、その周波数上限をフーリエ変換の対象となる時間領域での最大泳動バンド出現頻度とし、その周波数下限を同時間領域での最小泳動バンド出現頻度とすることを特徴とする塩基配列決定装置。

【請求項2】 フーリエ変換の対象となる時間領域より長い泳動時系列信号を重なる部分をもつ複数の領域に分割し、各領域に対してフーリエ変換、フィルタ処理及び逆フーリエ変換の操作を施し、重なっていない部分はその時間領域の計算結果をそのまま使用し、重なり合った部分はそれぞれの計算結果の重みつき平均を計算結果として使用する請求項1に記載の塩基配列決定装置。

【請求項3】 フーリエ変換の対象となる時間領域を泳動時系列信号全体の小さい一部分とし、その小さい領域でそれぞれの設定値に従ってフィルタ手段の帯域フィルタの上限又は下限の周波数を変更する請求項2に記載の塩基配列決定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は蛍光ラベルした核酸断片をゲル電気泳動装置のスラブ状ゲルのサンプル投入部に末端塩基別に投入して同時に泳動させ、泳動方向と直交する方向に走査される励起・検出系によって泳動途中で蛍光を検出して、データ処理装置で塩基配列を決定するオンライン式の塩基配列決定装置に関するものであり、その中の102～105ページに「周波数領域法」の記載がある。塩基配列決定装置の信号処理方式にフーリエ・フィルタを用いた例は、Smith et al; Nature, Vol. 321, pp. 674～679(1986)に記載されている。信号処理方法でフーリエ・フィルタを用いるのはノイズ処理

のためである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上記の何れの文献にも現実の蛍光泳動信号に対するフィルタの最適設計法が示されておらず、単にフーリエ・フィルタを用いてノイズ処理を行なう考え方の提示に留まっている。また、フーリエ・フィルタ法では多くのメモリを費やすため、長い泳動時系列信号をいくつかの区間に分けて処理する必要が生じるが、この場合の信号の重ね合わせについても上記の文献には何の記述もなされていない。本発明は塩基配列決定装置で得られる蛍光泳動信号のフーリエ・フィルタ処理において、フィルタの形を明確にして信号処理を現実的なものとすることを目的とするものである。本発明はまた、長い泳動時系列信号に対してそれをいくつかの区間に分割してフーリエ・フィルタ処理する方法を提供することを目的とするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明では、塩基配列決定装置の信号処理におけるフーリエ・フィルタ処理のフィルタ関数をフーリエ変換後の関数の実部と虚部に同じ形でかける帯域通過フィルタとし、その周波数上限をフーリエ変換の対象となる時間領域での最大泳動バンド出現頻度とし、その周波数下限を同時間領域での最小泳動バンド出現頻度とする。

【0005】 長い泳動時系列信号を処理する好ましい態様では、フーリエ変換の対象となる時間領域より長い泳動時系列信号を重なる部分をもつ複数の領域に分割し、各領域に対してフーリエ・フィルタ処理を施し、重なっていない部分はその時間領域の計算結果をそのまま使用し、重なり合った部分はそれぞれの計算結果の重みつき平均を計算結果として使用する。

【0006】 信号を取得しながらデータ処理を行なえるようにする好ましい態様では、フーリエ変換の対象となる時間領域を泳動時系列信号全体の小さい一部分とし、その小さい領域でそれぞれの設定値に従ってフィルタ手段の帯域フィルタの上限又は下限の周波数を変更する。

【0007】

【作用】 泳動レーンの時系列信号にフーリエ変換を施した後の裏関数に対してその実部と虚部に同型のフィルタをかけると、信号の位相による誤差がなくなる。フィルタの周波数上限と下限を上記のように泳動バンドの出現頻度に応じて設定することにより、ノイズ(高周波ノイズと低周波トレンド)と信号の最適な区別ができる、S/N比が向上する。長い時系列信号に対しては複数の領域に分け、それぞれについてフーリエ・フィルタ処理を施した後、上記のように重みをつけて重ね合わせることにより、少ないメモリ容量ですばやく目的のノイズ除去がなされる。

【0008】

【実施例】 図1から図5により具体例をあげて本発明を

説明する。図1に示されるように、得られた泳動時系列信号には1レーン当たり10000個のデータがあるとする。4レーンで1サンプルを構成するので、1サンプルとしては40000個のデータがあることになる。これを $a_0 \sim a_{1000}$ という数列で表わす。10000個のデータに対してフーリエ変換部40で8192 (= 2^{13})点のフーリエ変換を施す。フーリエ変換手段40では8192個の実部と虚部のそれぞれのデータを高速フーリエ変換する。この時、入力信号の実部としては入力データを用い、虚部はすべて0とおく。

【0009】フーリエ変換手段40では高速フーリエ変換アルゴリズムを使用することによりその高速性という利点を生かすことができるが、このアルゴリズムはサンプル数が2のn乗個にならないと使用できない。この例では 2^{13} (=8192)個のデータについて処理するので、与えられた10000個のデータ全てを1度のフーリエ変換で処理することはできない。したがって、この例ではフーリエ変換の計算を領域を変えて2度行なう。すなわち、1回目のフーリエ変換処理は $a_0 \sim a_{8191}$ の 2^{13} 個の点について行ない、2回目のフーリエ変換処理は $a_{1600} \sim a_{10000}$ の 2^{13} 個の点について行なう。

【0011】フーリエ変換後、フーリエ変換結果の関数はフィルタ手段42で帯域フィルタ(低域F1、高域Fh)にかけられる。フィルタ処理においては、フーリエ変換された裏関数では信号の実部は4096番目の点に対して線対称であり、虚部は点対称であるから、4096番目の点に対して線対称なフィルタ関数を用いるとよいことがわかる。このフィルタを実部(\cos 分)と虚部(\sin 分)の両方にかけることで位相の問題はなくなる。

【0012】フィルタをかけた後、逆フーリエ変換手段44で再び時間関数に戻し、その実部を探る。これにより元の信号からノイズが除去された信号が得られる。1回目のフーリエ・フィルタ処理で扱われたデータ $a_0 \sim a_{8191}$ についての8192点のデータの逆フーリエ変換の結果を $b_0 \sim b_{8191}$ とおき、2回目のフーリエ・フィルタ処理で扱われたデータ $a_{1600} \sim a_{10000}$ の逆フーリエ変換の結果を $C_{1600} \sim C_{10000}$ とおく。

【0013】2つの処理結果を平均化部46で重みつき平均処理し、最終的に $A_0 \sim A_{10000}$ のデータを得る。このように、重みつき平均をとる理由は、高速フーリエ変換アルゴリズムではその境界条件として周期的境界条件を暗黙のうちに仮定しており、変換領域の中心部分では変換が比較的正しく行なわれるが両端付近では変換誤差を生じるため、その影響を軽減するためである。

【0014】次に、フィルタ手段42におけるフィルタ関数の定数である周波数の上限Fhと下限F1の決定方法について説明する。信号の基本周波数が最大になるのは、測定時間領域中に最も頻繁にバンドが出現する場合

であり、それは図2のように8192点中に4つのレーン(A, G, C, T)の信号が全て1つのレーンに集中して出てきたと仮定した場合に当たる。ところで、図3は後で図6に示す泳動装置を用いて、50°Cの温度下で、幅が260mm、電圧印加部の長さが340mm、厚さが0.25mmの大きさの6%ポリアクリルアミドゲルを用い、20Wの定電力で泳動させ、泳動距離が上端から280mmのところでレーザ光で励起して蛍光を検出した場合の泳動時間に対する出現塩基数のグラフである。これでみると、特にノイズ除去の必要な長塩基数の領域(図3中のA領域)では、約5時間かかる190塩基程度が出てることがわかる。いま、図6の装置で5秒ごとに移動ステージを走査していると仮定すると、8192点では最大428塩基のピークが出現する可能性がある。190塩基×8192点/3600点=428塩基したがって、この場合Fh=428と設定するのが適当である。

【0015】信号の基本周波数が最小になるのは、図4のように1つのレーンに出てきたピークの間隔が最も広い場合に当たる。多くの配列を検討した結果、ピークの間隔が20塩基以上離れている場合は極めてまれであり、もし20塩基以上離れていても図1のフィルタ手段42に示されるようにF1以下の低周波にテープをつけておけば、信号はひずむものの信号の出現は確認できるので、

$$\text{ピーク間隔} = (3600 \text{点}/190 \text{塩基}) \times 20 \text{塩基}$$

$$F1 = 8192 \text{点}/\text{ピーク間隔} \approx 22$$

と設定するのが適当である。

【0016】図5により他の実施例を説明する。図1におけるフーリエ変換手段40、フィルタ手段42及び逆フーリエ変換手段44を256点(= 2^8 点)と比較的小さいデータ数で構成し、取得した時系列信号を64点ずつ重ねて次々とフーリエ・フィルタ処理し、重みつき平均化を施していく。このように小さいデータ数に分割すれば、信号を取得しながらデータ処理をするマルチマスクに向くほか、特に処理区間すなわち泳動開始からの時間によってフィルタの上限周波数と下限周波数を変えていくことができる、ノイズ成分を一層効果的に除去することができ、S/N比がさらに向上する。

【0017】図3の例を詳しく見ると、泳動開始から5時間を境にして塩基当たりのバンド出現時間間隔が変わっていることがわかる。この傾向は多少なりともどの泳動にも見られ、よりS/N比のよい信号を得るには泳動開始からの時間によってフィルタの特性を変化させることが必要である。データ数256点で分割してフーリエ・フィルタ処理し重みつき平均化を施していく図5の例の場合、図1に示される例と同様の計算をした結果、図3のB領域ではFh=16, F1=1, A領域ではFh=14, F1=1程度が適当である。

【0018】図6に本発明が適用される塩基配列決定装

5

置の一例を示す。2はスラブ状泳動ゲルであり、ポリアクリルアミドゲルが使用されている。泳動ゲル2の両端は電極層4, 6に浸され、電極層4, 6には電解液が収容されている。電極層4, 6の間には泳動電源8によって泳動電圧が印加される。泳動ゲル2の一端には試料を注入するためのサンプル投入スロット10が設けられており、サンプル投入スロット10の各々の所定の場所には末端塩基別のサンプルが投入される。サンプルは蛍光物質であるF I T Cにより既知の方法で標識化され、サンガー法により末端に塩基A, G, T, Cのそれぞれがくるように処理された4種類のDNA断片である。F I T Cは488 nmの波長のアルゴンレーザで励起され、520 nmの波長の蛍光を発する。泳動電源8により泳動電圧が印加されると、サンプルは泳動バンド16となって泳動方向14に時間とともに泳動ゲル2中を泳動して分離されていき、測定部に達する。

【0019】測定部には488 nmのレーザ光を発するアルゴンレーザ18からの励起光を集めレンズ20とミラー21によって照射する励起系と、その励起光ビームが当たった所に泳動バンド16があればその泳動バンド16の蛍光物質から発せられた蛍光を対物レンズ22で集め、520 nmの干渉フィルタ24、集光レンズ26から光ファイバ束27を経て光電子増倍管28で検出する検出系とが設けられている。集光レンズ20、ミラー21、対物レンズ22、干渉フィルタ24、集光レンズ26及び光ファイバ束27を含む励起・検出系には、励起光ビーム照射位置が泳動方向14と直交する方向(走査方向29)の測定ライン上を一定時間ごとに走査するよう機械的に移動する走査ステージ30が備えられている。

【0020】光電子増倍管28の検出信号(蛍光信号)は増幅器及びA/D変換器32を経てデータ処理装置である信号処理マイクロコンピュータ31に取り込まれる。マイクロコンピュータ31にはまた、励起光ビームが泳動ゲル2上の測定部を照射するときに、その照射部の位置に対応した信号が走査データとして取り込まれる。このようにして、走査方向に走査して得られた全蛍光信号が場所情報とともにマイクロコンピュータ31に取り込まれる。

10 6

【0021】

【発明の効果】本発明では塩基配列決定装置の信号処理方法として、時系列信号にフーリエ・フィルタ処理を施す際に、これまで必ずしも明確でなかったフィルタの関数の形を最適化したので、S/N比のよい信号が取得できるようになり、塩基配列決定の誤差が少なくなる。長い泳動時系列信号を複数の領域に分割し、各領域に対してフーリエ・フィルタ処理を施した後に重みつき平均化処理を施して重ね合わせるようにすれば、長い泳動信号についても解析が可能となり、装置の応用が広がる。とりわけ、信号をとりながらマルチタスクで取得して信号の解析や塩基配列決定を行なうシステムに有効に応用することができる。その場合256ドット(2⁸点)程度の小区間でのフーリエ・フィルタ処理を重ねながら繰返し使用することにより、リアルタイム処理に近い処理が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】一実施例におけるデータ処理に関する部分を示すブロック図である。

【図2】フィルタの上限周波数を決めるための波形図である。

【図3】泳動時間に対する出現塩基数の関係を示す図である。

【図4】フィルタの下限周波数を決めるための波形図である。

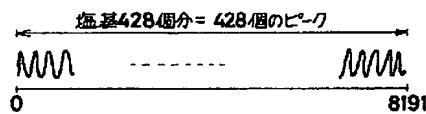
【図5】他の実施例におけるデータ処理に関する部分を示すブロック図である。

【図6】本発明が適用される塩基配列決定装置を示す要部斜視図である。

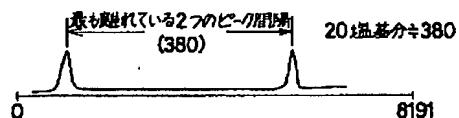
30 【符号の説明】

- | | |
|----|-------------|
| 2 | ポリアクリルアミドゲル |
| 16 | 泳動バンド |
| 28 | 光電子増倍管 |
| 30 | 走査ステージ |
| 31 | マイクロコンピュータ |
| 40 | フーリエ変換手段 |
| 42 | フィルタ手段 |
| 44 | 逆フーリエ変換手段 |
| 46 | 平均化手段 |

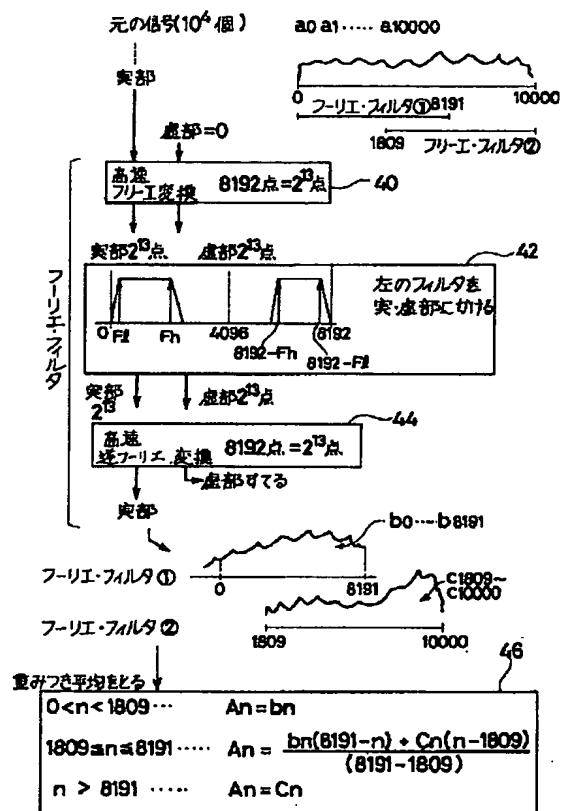
【図2】



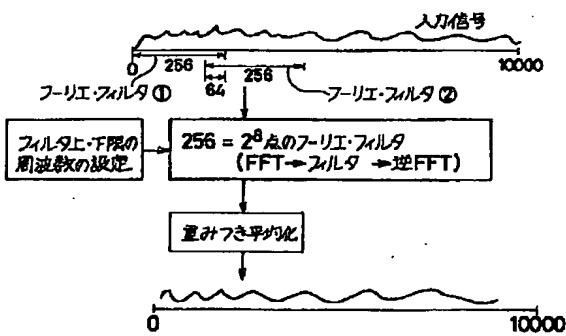
【図4】



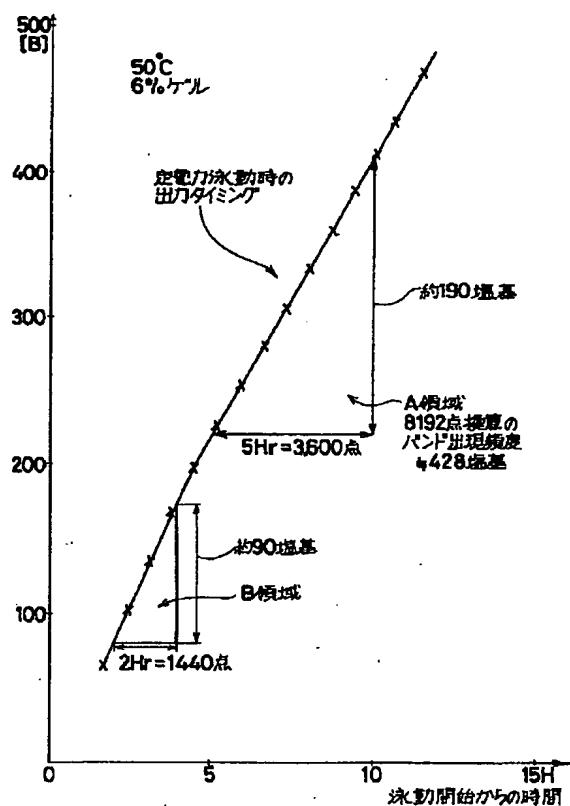
【図1】



【図5】



【図3】



【図6】

